

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijska  
dijagnostika**

**Monika Petrović**

**UČESTALOST MUTACIJE V617F U  
GENU *JAK2* U POPULACIJI  
OBOLJELIH OD  
MIJELOPROLIFERATIVNIH  
ZLOĆUDNIH TUMORA NA PODRUČJU  
ISTOČNE HRVATSKE**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2018.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijska  
dijagnostika**

**Monika Petrović**

**UČESTALOST MUTACIJE V617F U  
GENU *JAK2* U POPULACIJI  
OBOLJELIH OD  
MIJELOPROLIFERATIVNIH  
ZLOĆUDNIH TUMORA NA PODRUČJU  
ISTOČNE HRVATSKE**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2018.**

Rad je ostvaren u Laboratoriju za molekularnu i HLA dijagnostiku, Odjela za laboratorijsku dijagnostiku i kliničku transfuzijsku medicinu, Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu, Kliničkog bolničkog centra Osijek.

Mentor rada: doc. dr. sc. Saška Marči.

Rad ima 36 listova, 6 tablica i 3 slike.

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem mentorici, doc. dr. sc. Saški Marczy na stručnoj pomoći i potpori tijekom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem pročelnici Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu, prof. prim. dr. sc. Marini Samardžija, dr. med. spec. transfuziologije, na stručnoj pomoći i podršci tijekom studiranja.

Zahvaljujem kolegicama na Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Osijek na suradnji i razumijevanju tijekom studiranja.

Veliko hvala obitelji na razumijevanju i podršci.

## Sadržaj:

1. UVOD .....	1
1.1. Stanično signaliziranje.....	1
1.2. Signalni put JAK/STAT .....	1
1.3. Janus kinaza JAK2.....	3
1.4. Mutacija V617F gena <i>JAK2</i> .....	3
1.5. Mijeloproliferativni zloćudni tumori .....	4
1.5.1. Policitemija vera .....	5
1.5.2. Esencijalna trombocitemija.....	5
1.5.3. Primarna mijelofibroza .....	6
1.6. Ostale mutacije <i>BCR/ABL1</i> negativnih mijeloproliferativnih neoplazmi.....	7
1.7. Molekularna dijagnostika mutacije V617F gena <i>JAK2</i> .....	7
2. CILJEVI .....	9
3. ISPITANICI I METODE .....	10
3.1. Ustroj studije.....	10
3.2. Ispitanici .....	10
3.3. Metode .....	10
3.3.1. Izolacija DNK iz pune krvi .....	10
3.3.2. Određivanje koncentracije i čistoće DNK .....	11
3.3.3. Detekcija mutacije V617F gena <i>JAK2</i> metodom alel specifičnog PCR u stvarnom vremenu (real time PCR) .....	11
3.4. Statistička obrada podataka .....	13

4. REZULTATI.....	14
4.1. Osnovna obilježja ispitanika oboljelih od <i>BCR/ABL1</i> negativnih MPN .....	14
4.2. Učestalost JAK2 V617F u policitemiji veri .....	15
4.3. Učestalost JAK2 V617F u esencijalnoj trombocitemiji .....	16
4.4. Učestalost JAK2 V617F u primarnoj mijelofibrozi .....	17
4.5. Usporedba učestalosti mutacije V617F gena <i>JAK2</i> između podtipova <i>BCR/ABL1</i> negativnih MPN u različitim populacijama.....	18
5. RASPRAVA.....	20
6. ZAKLJUČCI .....	22
7. SAŽETAK.....	23
8. SUMMARY .....	24
9. LITERATURA.....	25
10. ŽIVOTOPIS .....	28

## POPIS KRATICA

TNF čimbenik tumorske nekroze (engl. *tumor necrosis factor*)

TGF transformirajući čimbenik rasta (engl. *transforming growth factor*)

STAT porodica transkripcijskih čimbenika (engl. *signal transducers and activators of transcription*)

IL–1 interleukin 1 (engl. *interleukin 1*)

JAK janus kinaza (engl. *janus kinase*)

SH2 dio molekule protein tirozin kinaze (engl. *SRC homology 2*)

TYK2 tirozin kinaza 2, član porodice Janus kinaza (engl. *tyrosine kinase 2*)

JH1 homologna domena 1 (engl. *jak homology 1*)

JH2 pseudokinazna domena 2 (engl. *pseudokinase domain 2*)

JAK2 gen JAK2 (engl. *JAK2 gene*)

V617F zamjena aminokiseline valina fenilalaninom u kodonu 617

PI3K/AKT unutarstanični signalni put fosfatidil–inozitol–3–kinaza (engl. *phosphoinositol 3–kinase*) i AKT protein kinaza B (engl. *serine/threonine kinase, protein kinase B*)

MAPK/ERK unutarstanični signalni put protein kinaza aktivirana mitogenom (engl. *mitogen activated protein kinase*) i kinaza aktivirana izvanstaničnim signalom (engl. *extracellular signal/regulated kinase*)

BCR/ABL1 fuzijski gen nastao translokacijom genskog materijala s kromosoma 9 na kromosom 22

MPN mijeloproliferativni zloćudni tumori (neoplazme) (engl. *myeloproliferative neoplasms*)

SZO Svjetska zdravstvena organizacija

Ph Philadelphia kromosom (engl. *Philadelphia chromosome*)

KML kronična mijeloidna leukemija

PV policitemija vera

ET esencijalna trombocitemija

PMF primarna mijelofibroza

*MPL* mijeloproliferativni leukemijski gen (engl. *myeloproliferative leukemia protein*)

*CALR* gen za kalretikulin (engl. *CALR gene*)

*TET2* član onkogene obitelji *TET* (engl. *oncogene family member 2 gene*)

*CBL* član onkogene obitelji *CBL* (engl. *casitas B lineage lymphoma proto oncogene*)

PCR lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)

ARMS engl. *amplification refractory mutation system*

dHPLC engl. *denaturing high performance liquid chromatography*

KBCO Klinički bolnički centar Osijek

EDTA etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

DNK deoksiribonukleinska kiselina

Taq DNK polimeraza enzim DNK polimeraza dobiven iz bakterije *Thermus aquaticus*

Cp engl. *Crossing point*

VF mutacija V617F

PC pozitivna kontrola (engl. *positive control*)

COS uzorak koji sadrži 1% V617F alela (engl. *crossing point cut off sample*)

SD standardna devijacija

WT divlji tip (eng. *wild type*)



## 1. UVOD

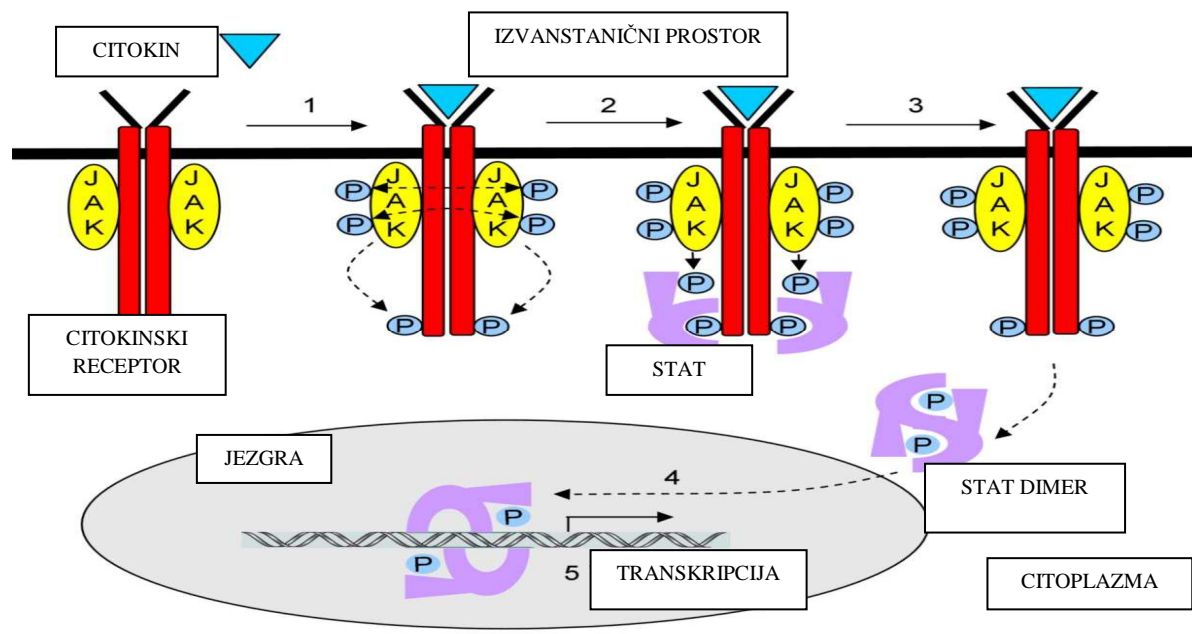
### 1.1. Stanično signaliziranje

Stanica je osnova strukture i funkcije biljnog i životinjskog svijeta. U višestaničnom organizmu funkcija stanice ovisi o komunikaciji s drugim stanicama. Na koji će način stanice međusobno komunicirati ovisi o vrsti stanične regulacije. Stanice mogu izlučivati u okolinu i/ili na svojoj površini izložiti signalne molekule koje će se vezati za receptore drugih stanica te sudjelovati u daljnjim staničnim aktivnostima. Signalne molekule obuhvaćaju veliki broj molekula različite strukture i funkcije: jednostavne plinove, steroidne hormone, neurotransmitere, peptidne hormone, čimbenike rasta (1). Receptori mogu biti smješteni na staničnoj membrani, u citosolu ili u jezgri. Na temelju mehanizma signaliziranja i aktivacije signalnih puteva mogu se razvrstati na: receptore koji se koriste nereceptorskim tirozin kinazama, receptorske tirozin kinaze, jezgrine receptore, receptore spregnute s G proteinima i ostale skupine receptora (2).

### 1.2. Signalni put JAK/STAT

Jedna od skupina signalnih molekula su citokini. To su molekule peptidne ili glikopeptidne građe brojnih bioloških učinaka. Djeluju na aktivaciju, proliferaciju i diferencijaciju širokog spektra stanica. Nazivlje citokina nije dosljedno. Neki od citokina nazivaju se interleukini, s odgovarajućim rednim brojem (tip I, tip II), dok su drugi nazvani prema biološkom djelovanju (čimbenici tumorske nekroze (TNF; engl. *tumor necrosis factor*), transformirajući čimbenik rasta (TGF; engl. *transforming growth factor*)). Receptori za citokine sastoje se od jednog ili više transmembranskih peptida čiji su izvanstanični dijelovi odgovorni za vezanje citokina, a citoplazmatski dijelovi za aktiviranje unutarstaničnih signalnih puteva. Kod većine citokinskih receptora vezanjem citokina aktivira se nakupljanje receptora pri čemu citoplazmatski dijelovi dviju ili više receptorskih molekula dolaze u blizinu. Time bude potaknuta aktivnost specifičnih nereceptorskih tirozin kinaza (2). Citokinski receptori dijele se na temelju građe izvanstanične domene za vezanje citokina i na temelju sličnosti unutarstaničnih mehanizama prijenosa signala na 4 porodice: hematopoetinska porodica (za citokine tipa I), interferonska (za citokine tipa II), receptori za citokine porodice TNF i receptori za interleukin 1 (IL-1; engl. *interleukin-1*) (2, 3).

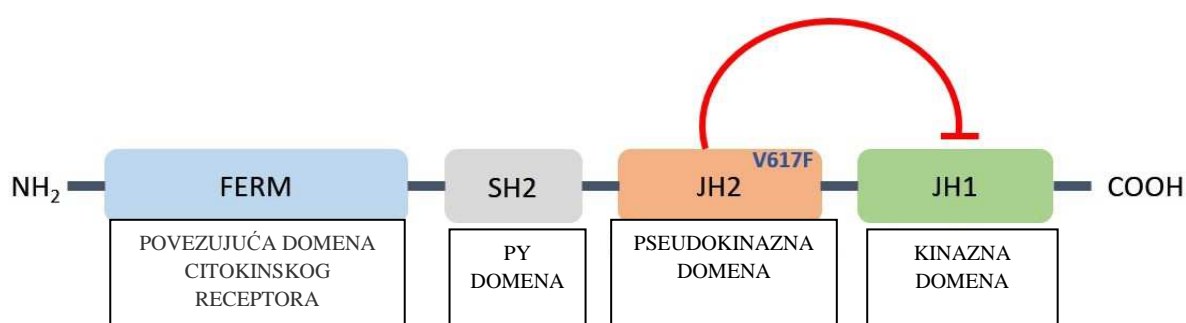
Receptori za citokine tipa I i tipa II za prijenos signala u citoplazmu koriste nereceptorske tirozin kinaze, Janus kinaze (JAK). Janus kinaze prenose signal uglavnom putem transkripcijskih čimbenika porodice STAT (engl. *signal transducers and activators of transcription*) (Slika 1.) (2, 3). Na citoplazmatske domene receptora za citokine tipa I i II vezani su nekovalentno inaktivni enzimi JAK. Uslijed vezanja citokina na izvanstanični dio receptora receptorske molekule se približe što uzrokuje aktivaciju JAK molekula. Aktivirane JAK tirozin kinaze fosforiliraju se međusobno te fosforiliraju tirozinske ostatke u citoplazmatskim domenama receptora. Fosfotirozinske ostatke prepoznaju i na njih se vežu SH2 domene (engl. *SRC homology 2*) monomernih STAT molekula. Janus kinaze vezane na receptore fosforiliraju tirozinski ostatak u SH2 domeni molekule STAT. Zatim se formiraju STAT dimeri koji se premještaju u jezgru gdje se vežu na specifični slijed u molekulama DNK i reguliraju ekspresiju određenih gena (4). U sisavaca su do danas poznate 4 Janus kinaze JAK1, JAK2, JAK3 i TYK2, te sedam aktivatora transkripcije (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b i STAT6). Određeni tipovi Janus kinaza selektivno se vežu na citoplazmatske domene specifičnih citokinskih receptora (2, 4, 5).



Slika 1. Shematski prikaz signalnog puta JAK/STAT. Preuzeto i prilagođeno s dopuštenjem autora (4).

### 1.3. Janus kinaza JAK2

JAK su citoplazmatske proteinske molekule koje pripadaju obitelji unutarstaničnih nереceptorskih tirozin kinaza. Naziv su dobile po Janusu, rimskom bogu s dva lica koja simboliziraju početak i svršetak, analogno njihovoj građi od dvije simetrične kinazne domene. JAK-homologna domena 1 (JH1; engl. *jak homology 1*) pokazuje kinaznu aktivnost. Za pseudokinaznu domenu 2 (JH2; engl. *pseudokinase domain 2*) za koju se do nedavno smatralo da je enzimski inaktivna najnovije studije pokazuju da ima nisku razinu katalitičke aktivnosti. Domena JH2 ima ulogu negativne regulacije aktivnosti kinazne domene (Slika 2.) (6, 7).



Slika 2. Shematski prikaz proteinske strukture JAK2. Preuzeto i prilagođeno s dopuštenjem autora (8).

### 1.4. Mutacija V617F gena JAK2

Gen *JAK2* nalazi se na kratkom kraku kromosoma 9 (9p24). Zamjena purinske baze gvanina pirimidinskom bazom timin na položaju 1849 (c.1849G>T) u egzonu 14 gena *JAK2* dovodi do zamjene valina fenilalaninom u 617. kodonu (p.Val617Phe) (9). Zamjenjena aminokiselina se nalazi na mjestu kontakta katalitičke i pseudokinazne domene. Mutacija je smještena u domeni JH2 proteina JAK2 (Slika 2.). Zbog mutacije V617F dolazi do promjene u samoregulaciji proteina JAK2, do njegove trajne aktivacije te do aktivacije signalnih puteva JAK/STAT, PI3K/AKT i MAPK/ERK. Mutirani JAK2 aktivira STAT5 transkripcijski čimbenik čije su ciljne molekule brojni onkogeni što ima za posljedicu poremećeni stanični ciklus i pojačanu proliferaciju stanica (9).

Mutacija JAK2 V617F stečena je somatska mutacija koja pokazuje povećanu pojavnost u osoba starije životne dobi što se može objasniti akumulacijom molekularnih abnormalnosti i

povećanom genskom nestabilnosti (10). Prisutna je u oko 95 % bolesnika s policitemijom verom (PV), u 50 – 60 % bolesnika esencijalnom trombocitemijom (ET) i u oko 50 % bolesnika s primarnom mijelofibrozom (PMF) (9, 11, 12).

### 1.5. Mijeloproliferativni zloćudni tumori

Mijeloproliferativni zloćudne neoplazme (MPN) su grupa hematoloških bolesti koje dijele slične hematološke i stanične nepravilnosti. Prema klasifikaciji hematoloških malignih bolesti Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) mijeloproliferativne neoplazme podjeljene su u dvije osnovne skupine. Podjela se zasniva na prisutnosti ili odsutnosti *BCR/ABL1* fuzijskog gena odnosno *Philadelphia* kromosoma (Ph; engl. *Philadelphia chromosome*). Tako u MPN Ph<sup>+</sup> skupinu koja posjeduje fuzijski *BCR/ABL1* ubrajamo kroničnu mijeloidnu leukemiju (KML), a u MPN Ph<sup>-</sup> skupinu koja ne sadrži fuzijski *BCR/ABL1* ubrajamo PV, ET, PMF, mastocitozu, kroničnu neutrofilnu leukemiju i kroničnu eozinofilnu leukemiju koje dijele simptomatologiju i patogenezu povezanu uz promjene u staničnoj signalizaciji nastale mutacijom JAK2 (11, 13).

Iako je dokaz mutacije V617F gena *JAK2* jedan od kriterija za postavljanje dijagnoze *BCR/ABL1* negativnih MPN, njezin izolirani dokaz nije dovoljan. Do sada nije objašnjeno kako jedna mutacija može uzrokovati 3 različite bolesti različite u kliničkoj prezentaciji i prognozi (14).

Klinički tijek MPN i laboratorijske promjene su varijabilne, a podudarnosti koje se mogu pojaviti su splenomegalija, povećani rizik krvarenja ili tromboze, pretjerana proizvodnja jedne ili više stanica mijeloidne loze, fibroza koštane srži (13).

Svaka od triju klasičnih *BCR/ABL1* negativnih MPN (PV, ET i PMF) ima svoja histološka obilježja. Razlikuju se s obzirom na zahvaćenost mijeloidne loze, prisutnost fibroze i retikulina. Manje od 5 % bolesnika s ET pokazuje progresiju u akutnu leukemiju. Bolesnici s PV transformaciju u mijelofibrozu pokazuju relativno često (oko 10 % unutar 10 godina od dijagnoze). Transformacija bolesti ovise također i o načinu liječenja (11).

Utvrđeno je da je rizik za razvoj MPN 5 – 7 puta veći među srodnicima u prvom koljenu bolesnika s MPN što ukazuje na mogućnost prisutnosti genske sklonosti koja predisponira za MPN. Kako nema dokaza za genski prijenos mutacije JAK2 V617F nema razloga za rutinsko

testiranje rodaka osoba oboljelih od MPN u odsutnosti hematoloških ili kliničkih znakova bolesti (15).

### **1.5.1. Policitemija vera**

PV je zloćudna klonalna mijeloproliferativna neoplazma nastala transformacijom multipotentne matične stanice. Kroničnog je i progresivnog tijeka. Najčešće se pojavljuje u dobi od 50. do 60. godine, s učestalošću dva oboljela na 100 000 stanovnika. U perifernoj krvi dominira eritrocitoza s umjerenom leukocitozom i trombocitozom. Eritroidne matične stanice imaju osobinu autonomnog rasta i bez prisutnosti eritropoetina. Sukladno tomu na eritrocitopoezu ne utječu hipoksija, hiperoksija, ne smanjuje ju bubrežna insuficijencija, venepunkcije je ne stimuliraju. Etiologija nije poznata. Prisutne su su promjene genoma na razini primitivnih matičnih stanica koje zahvaćaju sve krvne loze. Vjerojatno somatska mutacija uzrokuje razvoj bolesti no njezina priroda nije poznata. Najčešće opisana genska promjena jest mutacija JAK2 V617F prisutna u više od 90 % bolesnika. Najčešći simptomi su glavobolja, slabost, svrbež kože, vrtoglavice i pojačano znojenje. Bolest se često otkriva slučajno pregledom krvne slike zbog nekog drugog razloga. Smetnje koje uzrokuje PV su najčešće posljedica povećane viskoznosti krvi. Bolesnikova koža i sluznice su izrazito crvene, kongestivne, a prisutna je i cijanoza distalnih dijelova ekstremiteta. Komplikacije su bolesti tromboze i krvarenja. Broj eritrocita izrazito je povećan. Broj leukocita povećan je na račun povećanog broja neutrofila, često sa skretanjem u lijevo i bazofilijom. Broj je trombocita povećan u oko polovice bolesnika pri dijagnozi. U bolesnika u kojeg postoje eritrocitoza, leukocitoza, trombocitoza, mikrocitoza, splenomegalija te simptomi poput generaliziranog svrbeža, podaci o trombocitozi ili znakovi eritromegalije nema dijagnostičkih dilema. Ako je hemoglobin izrazito povećan uz nalaz mutacije JAK2 V617F, dijagnoza PV je sigurna. U slučaju negativnog JAK2 V617F i mutacije JAK2 na egzonu 12 treba odrediti eritropoetin u serumu. Pri povećanom broju eritrocita u PV proizvodnja eritropoetina treba biti suprimirana. Sniženi eritropoetin ukazuje na PV, povišeni na sekundarne policitemije, a normalan je ne isključuje, nego je potreban histološki pregled koštane srži. Histološki policitemija pokazuje hiperplaziju svih triju loza (11).

### **1.5.2. Esencijalna trombocitemija**

ET je klonalna mijeloproliferativna bolest koja se očituje povećanom megakariocitopoezom s trombocitozom višom od  $450 \times 10^9/L$ . Pojavljuje se u starijoj dobi i treba je razlikovati od

relativno čestih stanja sa sekundarnom, reaktivnom trombocitozom. Abnormalno je ekspaniran odjeljak megakariocitnih matičnih stanica u koštanoj srži. Razina je trombopoetina u klonalnoj trombocitozi, tj. esencijalnoj trombocitemiji povećana i rezultat je promjene u razini regulacije receptora za trombopoetin na megakariocitima. Klonalni defekt u ekspresiji receptora za trombopoetin uzrokuje poremećaj vezanja trombopoetina i njegovu neočekivano visoku razinu. Megakariociti su pretjerano osjetljivi na djelovanje trombopoetina što dovodi do njihove pojačne diferencijacije i pretjerane produkcije trombocita. Oko 50 % bolesnika s ET pozitivno je na mutaciju JAK2 V617F. Prisutnost te mutacije omogućuje razlikovanje ET od reaktivne trombocitoze. Glavni uzroci morbiditeta su krvarenja i tromboze. Krvarenja se pojavljuju spontano ili nakon manje traume, a tipična su mjesta krvarenja sluznice i gastrointestinalni trakt. Trombotične su komplikacije, u pravilu, arterijske tromboze. Karakteristična je komplikacija eritromegalija karakterizirana jakim pečenjem ili pulsirajućim bolom u udovima, najčešće u stopalima. Broj trombocita može varirati od tek blagog povećanja do nekoliko tisuća  $\times 10^9/L$ , katkad praćena blagom anemijom i leukocitozom. Koštana je srž hipercelularna s hiperplazijom megakariocitopoeze. U perifernoj krvi trombociti su veliki i pojavljuju se u nakupinama. U koagulogramu nema bitnijih promjena unatoč trombocitozi i poremećaju funkcije trombocita. Kako nema karakterističnog biljega za postavljanje dijagnoze, ona se temelji na isključivanju uzroka reaktivne (sekundarne) trombocitoze i nalaza koji su karakteristični za druge mijeloproliferativne zloćudne tumore. Bolest je kroničnog tijeka i rijetko prelazi u drugu mijeloproliferativnu bolest. Uzroci su morbiditeta i mortaliteta krvarenja i tromboze (11).

### **1.5.3. Primarna mijelofibroza**

Primarna mijelofibroza ili mijelofibroza s mijeloidnom metaplazijom, klonalna je bolest matične krvotvorne stanice koju karakteriziraju ekstramedularna hematopoeza u slezeni ili u više organa te reaktivna fibroza koštane srži. Očituje se izrazitom splenomegalijom, progresivnom anemijom i općim simptomima. Pojavljuje se većinom nakon 50. godine života, jednako u oba spola. Učestalost je 1 – 2 oboljela na 100 000 stanovnika. Zloćudni tumor nastaje u jednoj matičnoj krvotvornoj stanici i kao posljedica se javlja nedjelotvorna eritrocitopoeza, sinteza promjenjenih megakariocita i povećani udio nezrelih stanica mijeloidne loze. Ekstramedularna hematopoeza se može pojaviti u raznim organima i dijelovima tijela. Karakteristične su morfološke promjene eritrocita u obliku pojave dakrocita

tj. eritrocita oblika kao suza. Eritroblasti u perifernoj krvi su redovit nalaz. Leukocitoza je umjerena, a u diferencijalnoj krvnoj slici nalazi se skretanje ulijevo. Broj trombocita može biti normalan ili smanjen uz morfološke promjene trombocita. Biopsijom koštane srži histološki se nalazi fibroza. Karakteristična je hiperplazija granulocitopoeze i megakariocitopoeze s postojanjem retikulinskih vlakana. Dijagnoza se temelji na kriterijima podjele prema SZO. Tijek je bolesti kroničan i progresivan. Nepovoljni čimbenici za tijek bolesti jesu dob > 70 godina, hemoglobin < 100 g/L, mijeloblasti u perifernoj krvi > 2 %, > 2 % eritronormoblasta u perifernoj krvi, leukocitoza >  $20 \times 10^9/L$ , trombocitopenija <  $300 \times 10^9/L$ , masivna splenomegalija i citogenetske promjene (11).

### 1.6. Ostale mutacije *BCR/ABL1* negativnih mijeloproliferativnih neoplazmi

Mnoge mutacije mogu djelovati sinergijski s JAK2 V617F mutacijom ili samostalno utjecati na patogenezu MPN. U osoba koje pokazuju kliničke i laboratorijske znakove MPN a negativan nalaz JAK2 V617F moguće je postojanje mutacija u drugim genima.

Mutacije u egzonu 12 gena *JAK2* pokazuju slične stanične i kliničke značajke kao mutacija u egzonu 14. U bolesnika s PV negativnim na mutaciju JAK2 V617F identificirano je 37 mutacija egzona 12 gena *JAK2*, 11 supstitucija, 20 delecija i 6 duplikacija (16,17). U oko 1 % bolesnika s ET nađena je mutacija mijeloproliferativnog leukemijskog gena (*MPL*; engl. *myeloproliferative leukemia protein*) koji kontrolira sintezu proteina trombopoetinskog receptora (11). Mutacija gena *CALR* (*CALR*; engl. *CALR gene*) koji kodira protein kalretikulin pojavljuje se u oko 10 – 15 % bolesnika s ET i PMF. Relativno se rijetko u *BCR/ABL1* negativnim MPN javljaju mutacije gena *TET2* (engl. *oncogene family member 2 gene*) (9), gena *CBL* (engl. *casitas B lineage lymphoma proto oncogene*) (18) i nekolicine drugih mutacija od kojih ni jedna nije specifična za određeni tip MPN (11).

### 1.7. Molekularna dijagnostika mutacije V617F gena *JAK2*

Testiranje na mutaciju JAK2 V617F je dio rutinske dijagnostike *BCR/ABL1* negativnih MPN. Pozitivan nalaz prisutnosti mutacije s velikom sigurnošću upućuje na prisutnost maligne klonalne hematopoeze, ali ne može biti i jedini kriterij za postavljanje dijagnoze. Negativan nalaz ne isključuje prisutnost bolesti te je potrebno dijagnostiku dopuniti histološkim, kliničkim i laboratorijskim nalazima (11).

Predanalitičke i analitičke varijable kao što su odabir vrste uzorka, početnica, izolacija DNK utječu na kvalitetu izvođenja i konačni rezultat testiranja te su ustrojeni laboratorijski algoritmi testiranja. Molekularne tehnike testiranja mutacija moraju pratiti otkrića novih spoznaja u dijagnostici MNP (19).

Brojne molekularne tehnike koje se koriste u rutinskoj dijagnostici razlikuju se po osjetljivosti, jednostavnosti izvođenja, načinu izražavanja rezultata. Za detekciju mutacije JAK2 V617F danas se koriste različite tehnike: ARMS/alel-specifični PCR (engl. *amplification–refractory mutation system allele–specific polymerase chain reaction*), alel specifični PCR u stvarnom vremenu (engl. *allele–specific real time PCR*), analiza krivulje taljenja, analiza krivulje taljenja visoke rezolucije, cijepanje restrikcijskim enzimima, direktno sekvenciranje, pirosekvenciranje, dHPLC (engl. *denaturing high performance liquid chromatography*) (9).



## 2. CILJEVI

Ciljevi istraživanja su:

1. Odrediti učestalost prisutnosti somatske mutacije V617F u genu *JAK2* u skupinama oboljelih od policitemije vera, esencijalne trombocitemije i primarne mijelofibroze u populaciji istočne Hrvatske.
2. Usporediti dobivene rezultate s objavljenim literaturnim podacima.

### 3. ISPITANICI I METODE

#### 3.1. Ustroj studije

Istraživanje je ustrojeno kao retrospektivna studija (20).

#### 3.2. Ispitanici

Ispitivanu skupinu čini 59 pacijenata (26 muških, 33 ženskih) s područja istočne Hrvatske kojima je molekularna dijagnostika prisutnosti mutacije V617F u genu *JAK2* učinjena u rutinskom dijagnostičkom programu u Laboratoriju za molekularnu i HLA dijagnostiku Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Osijek tijekom 2016. i 2017. godine. Svi su ispitanici imali potvrđenu dijagnozu MPN (38 PV, 19 ET, 2 PMF). Istraživanje je provedeno u periodu od prosinca 2017. do srpnja 2018. godine. U istraživanju su korišteni podatci iz elektronske baze podataka Laboratorija za molekularnu i HLA dijagnostiku te podatci medicinske dokumentacije pacijenata u Odjelu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti KBCO. Studija je odobrena od etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek.

#### 3.3. Metode

##### 3.3.1. Izolacija DNK iz pune krvi

Izolacija genomske DNK izvodi se pomoću komercijalnog seta *High Pure PCR Template Preparation Kit* prema uputama proizvođača *Roche Diagnostics* (Mannheim, Njemačka) (21). Svim je ispitanicima uzeto 5 mL pune krvi u epruvetu s antikoagulansom EDTA.

U sterilnu se mikropipetu odvoji 200  $\mu$ L uzorka krvi, 200  $\mu$ L pufera za razgradnju i 40  $\mu$ L vodene otopine proteinaze K. Nakon miješanja uzorci su inkubirani 10 minuta na 72 °C. Nakon inkubacije je u smjesu dodano 100  $\mu$ L izopropanola, a potom je ukupni sadržaj prenesen u predhodno označene kolonice sa staklenom mrežicom. Centrifugiranjem u trajanju od 1 minute pri brzini 8000 x g, DNK ostaje vezana na staklenoj mrežici koja se prenosi na novu kolonicu. DNK se jednom ispiri s 500  $\mu$ L pufera za uklanjanje inhibitora i dva puta s po 500  $\mu$ L pufera za ispiranje, a poslije svakog predhodno navedenog koraka centrifugira se u vremenu od 1 minute pri brzini 8000 x g. Nakon posljednjega se centrifugiranja s mrežice uklanja ostatak pufera kratkim centrifugiranjem 10 sekundi pri brzini 13000 x g. DNK je eluirana dodatkom 200  $\mu$ L zagrijanoga (70 °C) elucijskog pufera na mrežicu i posljednjim

centrifugiranjem od 1 minute pri brzini 8000 x g prenesena u obilježenu mikroepruvetu za čuvanje uzoraka.

### 3.3.2. Određivanje koncentracije i čistoće DNK

Mjerenje koncentracije izolirane DNK vrši se pomoću UV/VIS nano–spektrofotometra. Zatim se koncentracija DNK u svakom uzorku prilagodi na 5 ng/μL. Za svaki bi uzorak DNK omjer apsorbancija  $A_{260}/A_{280}$  trebao biti 1,7 – 1,9. Ukoliko je taj omjer manji postoji mogućnost da je uzorak DNK kontaminiran proteinima ili organskim spojevima što može ometati PCR reakciju. Uzorci DNK se skladište na – 20 °C do postupka testiranja.

### 3.3.3. Detekcija mutacije V617F gena *JAK2* metodom alel specifičnog PCR u stvarnom vremenu (real time PCR)

Za detekciju mutacije V617F gena *JAK2* korišten je komercijalni set „Ipsogen *JAK2* MutaSearch“ (Qiagen, Hilden, Njemačka) prema uputama proizvođača.

Lančana reakcija polimerazom (PCR; engl. *polimerase chain reaction*) je metoda eksponencijalnog umnažanja fragmenata molekule DNK. PCR u stvarnom vremenu omogućava kvantifikaciju PCR produkta detekcijom fluorescentnog signala u stvarnom vremenu tijekom svakog PCR ciklusa čime se smanjuje mogućnost kontaminacije konačnog produkta i smanjuje se vrijeme testiranja.

Alel specifična PCR tehnologija omogućuje osjetljivu, točnu, reproducibilnu detekciju polimorfizama. Metoda se temelji na uporabi dva seta specifičnih početnica i proba koji se koriste u dvije odvojene PCR reakcije smjese. Tako je jedna reakcijska smjesa specifična za umnožavanje divljeg tipa *JAK2* dok je druga specifična za mutirani V617F *JAK2* alel. Za svaki se uzorak DNK pripreme obje specifične PCR smjese.

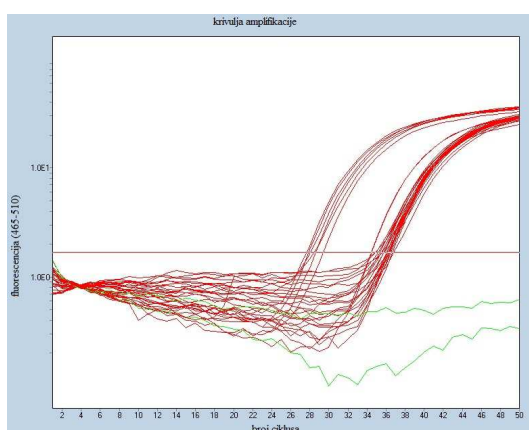
U PCR reakciji nizvodne (engl. *forward*) i uzvodne početnice (engl. *reverse*) se vežu na specifičan slijed unutar DNK uzorka i omogućavaju njezino umnažanje. Unutar iste reakcijske smjese nalazi se i oligonukleotidna proba obilježena s dvije boje. Na 5' kraju proba je obilježena reporter bojom, a na 3' kraju nalazi se boja prigušivač (engl. *quencher*). Proba se veže na ciljni slijed unutar PCR produkta i kada je netaknut blizina prigušivač boje reporter boji rezultira supresiji fluorescentne reporter boje. Ukoliko je unutar PCR produkta prisutan ciljni slijed proba se veže između mjesta vezanja nizvodnih i uzvodnih početnica. Taq DNK polimeraza koja se nalazi u reakcijskoj smjesi ima 5' → 3' egzonukleaznu aktivnost i tijekom

PCR reakcije cijepa probu na mjestu između reporter i prigušivač boje samo u slučaju kada je proba hibridizirala s ciljnim slijedom čime dolazi do emisije fluorescencije reporter boje. Porast fluorescencije detektira se samo u slučaju kada je ciljni slijed komplementaran probi što znači da je porast fluorescencije direktno proporcionalan umnažanju ciljnog slijeda tijekom reakcije. Za umnažanje odsječaka gena *JAK2* korišten je real time PCR uređaj LightCycler 480 II (Roche).

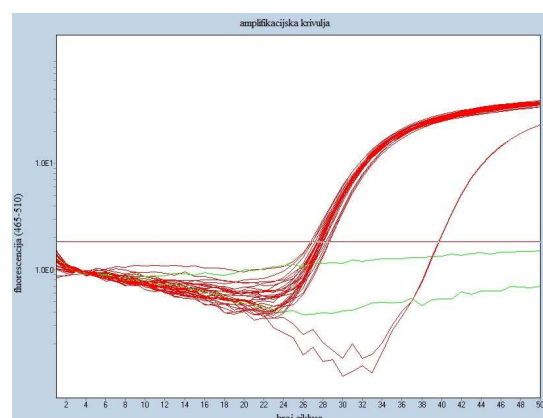
**Tablica 1.** Protokol PCR reakcije za detekciju mutacije V617F gena *JAK2* pomoću seta „Ipsogen JAK2 MutaSearch“

korak	broj ciklusa	temperatura	vrijeme
1	1	50 °C	2 min
2	1	95 °C	10 min
3	50	95 °C 63 °C	15 s 90 s

U PCR reakciji se odsječak DNK od interesa eksponencijalno umnožava. U kasnim ciklusima reakcije supstrati reakcije bivaju iscrpljeni, PCR produkt se ne udvostručuje i krivulja amplifikacije prelazi u ravan oblik, tzv. plato. Broj ciklusa u kojem na krivulji amplifikacije dolazi do naglog povećanja količine nastalog produkta, a očituje se naglim povećanjem fluorescencije, naziva se *Cp* (engl. *crossing point*) vrijednost (Slika 3.).



A



B

Slika 3. Primjer rezultata PCR reakcija detekciju mutacije V617F gena *JAK2* pomoću seta „Ipsogen JAK2 MutaSearch“ za niz od 30 uzoraka. (A) reakcijske smjese JAK2 V617F, (B) reakcijske smjese JAK2 WT

Za analizu rezultata se u real time PCR uređaju odabire *AbsQuant Fits Points Analysis mode*. Za svaki uzorak se očitavaju vrijednosti Cp u obje reakcijske smjese, kao i vrijednosti Cp za pozitivne i negativne kontrole. Dvije su pozitivne kontrole: PC–VF i cut off uzorak koji sadrži 1% V617F alela (COS–VF; engl. *crossing point cut off sample*). Očitane Cp vrijednosti uvrštavaju se u jednadžbu za izračun rezultata, prema uputama proizvođača seta za detekciju JAK2 V617F. Moguće interpretacije rezultata su: uzorak pozitivan ili negativan na mutaciju V617F.

### 3.4. Statistička obrada podataka

Rezultati istraživanja analizirani su pomoću statističkog programa TIBCO Statistica<sup>TM</sup> version 13.3 (TIBCO Software Inc.). Normalnost distribucije dobi u skupinama ispitanika testirana je Kolmogorov-Smirnov testom te su vrijednosti prosječne dobi prikazane kao *mean* sa odgovarajućom standardnom devijacijom (SD). Razlike numeričkih varijabli između skupina za dob i spol ispitanika te za prisutnost JAK2 V617F mutacije testirane su Kruskal-Wallis testom. Usporedba dobivenih rezultata s objavljenim literaturnim podacima učinjena je pomoću Fisherovog exact testa. P vrijednosti su dvostrane, razina značajnosti postavljena je na 0,05.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Osnovna obilježja ispitanika oboljelih od *BCR/ABL* negativnih MPN

Analizirano je 59 ispitanika od kojih je 38 (64,4 %) oboljelih od policitemije vere, 19 (32,2 %) s esencijalnom trombocitemijom i 2 (3,4 %) s primarnom mijelofibrozom (Tablica 2.).

**Tablica 2.** Ispitanici oboljeli od *BCR/ABL* negativnih MPN. Razdioba prema dobi, spolu i prisutnosti JAK2 V617F mutacije.

		N*	M / Ž (% M / Ž)	Dob ispitanika (godine) Mean ± SD	Broj JAK2 V617F pozitivni (%)
Podtip MPN	PV	38	18 / 20 (47,4 / 52,6)	63,3 ± 13,4	21 (55,3)
	ET	19	7 / 12 (36,8 / 63,2)	60,2 ± 16,5	14 (73,7)
	PMF	2	1 / 1 (50,0 / 50,0)	70,0 ± 7,1	1 (50,0)
Oboljeli od MPN ukupno		59	26 / 33 (44,1 / 55,9)	64,5 ± 12,3	36 (61,0)
Prisutnost JAK2 V617F mutacije	pozitivni	36	17 / 19 (47,2 / 52,8)	67,9 ± 10,4	
	negativni	23	9 / 14 (39,1 / 60,9)	53,9 ± 15,5	

\*Broj ispitanika

U skupini oboljelih od MPN 61,0 % (36/59) je bolesnika pozitivnih na mutaciju JAK2 V617. U MPN skupini ispitanika razlika pozitivnih i negativnih nije statistički značajna ( $P = 0,1573$ ). Nema velike razlike u broju muških i ženskih ispitanika u podskupinama MPN ( $P = 0,2231$ ). S obzirom na podtip MPN najviše bolesnika pozitivnih na mutaciju ima u skupini ET (73,7 %) u odnosu na PV i PMF, bez statističke značajnosti ( $P = 0,2231$ ). Najstariji su ispitanici oboljeli od PMF, bez statistički značajne razlike u odnosu na prosječnu dob ispitanika s PV i ET ( $P =$

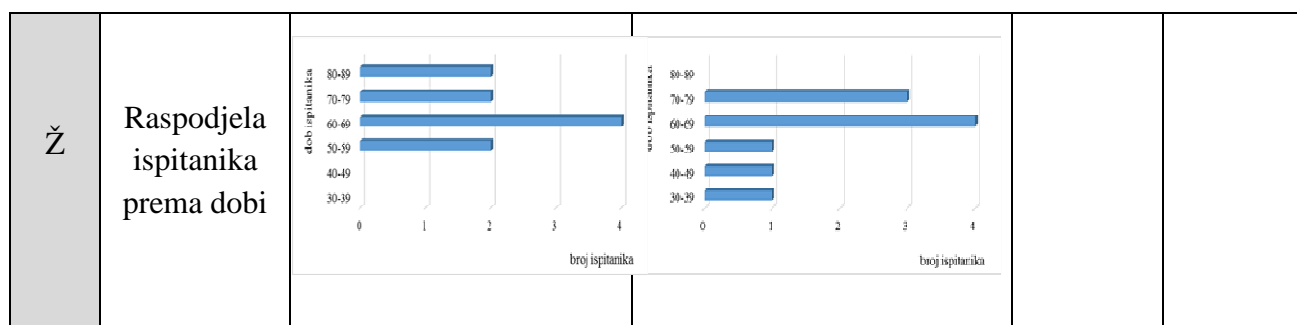
1,000).

#### 4.2. Učestalost JAK2 V617F u policitemiji veri

U skupini muških ispitanika oboljelih od PV veća je učestalost pozitivnih na mutaciju JAK2 V617F (61,1 %) u odnosu na negativne (38,9 %) (Tablica 3.). Nadalje, više je pozitivnih ispitanika u skupini muških (61,1 %) u odnosu na pozitivne u skupinu žena (50,0 %).

**Tablica 3.** Raspodjela prema dobi, spolu i prisutnosti mutacije JAK2 V617F u skupini ispitanika oboljelih od PV

PV					
		Prisutnost mutacije JAK2 V617F			
		Pozitivni	Negativni	P	Ukupno
M	N* (%)	11 (61,1)	7 (38,9)	0,1573	18
	Dob ispitanika (godine) mean±SD	70,5 ± 9,1 (min 53, max 85)	49,0 ± 14,9 (min 26, max 66)	0,0025	62,2 ± 15,6
	Raspodjela ispitanika prema dobi				
Ž	N* (%)	10 (50,0)	10 (50,0)	1,000	20
	Dob ispitanika (godine) mean±SD	68,1 ± 9,5 (min 51, max 81)	60,4 ± 12,3 (min 38, max 74)	0,1775	64,3 ± 11,4



\*Broj ispitanika

Može se uočiti statistički značajna razlika u prosječnoj dobi pozitivnih ( $70,5 \pm 9,1$ ) i negativnih ( $49,0 \pm 14,9$ ) ispitanika muškog spola. Oboljeli pozitivni za mutaciju su i u skupini muških i ženskih bolesnika s PV starije životne dobi u odnosu na oboljele koji su negativni za mutaciju JAK2 V617F.

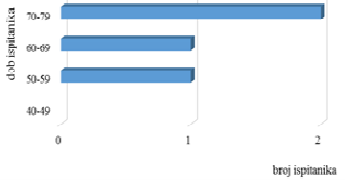
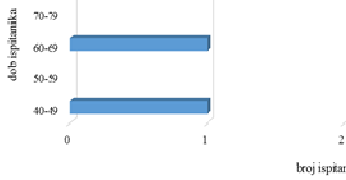
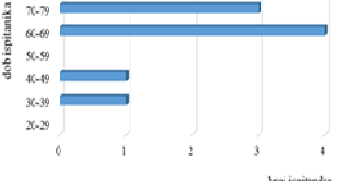
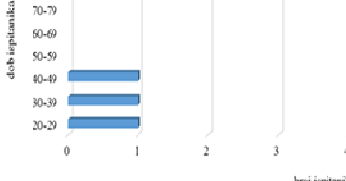
#### 4.3. Učestalost JAK2 V617F u esencijalnoj trombocitemiji

U skupini muških ispitanika oboljelih od ET veća je učestalost pozitivnih na mutaciju JAK2 V617F (71,4 %) u odnosu na negativne (28,6 %) (Tablica 4.). Udio pozitivnih ispitanika u muškoj (71,4 %) i ženskoj skupini (75,0 %) približno je jednak. Statistički je značajna razlika u prosječnoj dobi pozitivnih ( $64,0 \pm 13,6$ ) i negativnih ( $35,0 \pm 11,8$ ) ispitanika ženskog spola. Oboljeli pozitivni za mutaciju i u skupini muških i ženskih bolesnika s ET starije su životne dobi u odnosu na oboljele koji su negativni za mutaciju JAK2 V617F.

**Tablica 4.** Raspodjela prema dobi, spolu i prisutnosti mutacije JAK2 V617F u skupini ispitanika oboljelih od ET

ET					
		Prisutnost mutacije JAK2 V617F			
		Pozitivni	Negativni	P	Ukupno
M	N* (%)	5 (71,4)	2 (28,6)	0,1573	7
	Dob ispitanika (godine) mean $\pm$ SD	69,8 $\pm$ 10,2 (min 53, max 78)	56,5 $\pm$ 13,4 (min 47, max 66)	0,1473	66,0 $\pm$ 11,9



M	Razdioba ispitanika prema dobi				
Ž	N* (%)	9 (75,0)	3 (25,0)	0,1573	12
	Dob ispitanika (godine) mean±SD	64,0 ± 13,6 (min 36, max 79)	35,0 ± 11,8 (min 25, max 48)	0,0455	56,7 ± 18,2
	Razdioba ispitanika prema dobi				

\* Broj ispitanika

#### 4.4. Učestalost JAK2 V617F u primarnoj mijelofibrozi

**Tablica 5.** Raspodjela prema spolu i prisutnosti mutacije JAK2 V617F u skupini ispitanika oboljelih od PMF

PMF				
		Prisutnost mutacije JAK2 V617F		
		Pozitivni	Negativni	Ukupno
M	N* (%)	1	-	1
	Dob ispitanika (godine)	65	-	
Ž	N* (%)	-	1	1
	Dob ispitanika (godine)	-	75	

\* Broj ispitanika

#### 4.5. Usporedba učestalosti mutacije V617F gena *JAK2* između podtipova *BCR/ABL1* negativnih MPN u različitim populacijama

Učestalost mutacije V617F gena *JAK2* u PV, ET i PMF između naših pacijenata s područja istočne Hrvatske i oboljelih od *BCR/ABL1* negativnih MPN u drugim područjima Hrvatske (22, 23), Portugalu (24), Velikoj Britaniji (12), Zapadnom Alžiru (10), Egiptu (25), Jordanu (26), Indiji (27), Kini (28) i Brazilu (29) ne razlikuju se statistički značajno (Tablica 6.).

**Tablica 6.** Usporedba učestalosti *JAK2* V617F između podtipova *BCR/ABL1* negativnih MPN u različitim populacijama

	Broj ispitanika / broj <i>JAK2</i> V617F pozitivnih (% <i>JAK2</i> V617F pozitivnih) P			
	PV	ET	PMF	Ukupno
Istočna Hrvatska	38 / 21 (55,3)	19 / 14 (73,7)	2 / 1 (50,0)	59 / 36 (61,0)
Hrvatska (23)	85 / 79 (93,0) 0,127	22 / 12 (55,0) 0,621	15 / 8 (54,0) 1,000	122 / 99 (81,1) 1,000
Hrvatska (24)	17 / 10 (58,8) 1,000	20 / 14 (70,0) 1,000	10 / 3 (30,0) 1,000	47 / 27 (57,4) 0,874
Hrvatska Rijeka (25)	35 / 31 (88,6) 0,209	30 / 18 (60,0) 0,817	6 / 4 (66,7) 1,000	71 / 53 (74,6) 0,491
Portugal (26)	39 / 34 (87,2) 0,219	80 / 58 (73,4) 1,000	14 / 7 (50,0) 1,000	133 / 99 (74,4) 0,459
Velika Britanija (12)	73 / 71 (97,0) 0,088	51 / 29 (57,0) 0,670	16 / 8 (50,0) 1,000	140 / 108 (77,1) 0,392

Zapadni Alžir (10)	98 / 80 (81,6) 0,227	75 / 44 (58,7) 0,686	13 / 6 (46,2) 1,000	186 / 130 (69,9) 0,634
Egipat (27)	70 / 56 (80,0) 0,269	24 / 6 (25,0) 0,065	16 / 2 (12,5) 0,387	110 / 64 (58,2) 0,895
Jordan (28)	27 / 19 (70,4) 0,686	16 / 5 (31,2) 0,243	14 / 2 (14,3) 0,422	57 / 26 (45,6) 0,431
Indija (29)	34 / 28 (82,0) 0,355	10 / 7 (70,0) 1,000	13 / 6 (46,2) 1,000	75 / 51 (68,0) 0,781
Kina (30)	28 / 23 (82,1) 0,335	32 / 17 (53,1) 0,496	10 / 4 (50,0) 1,000	70 / 44 (62,9) 1,000
Brazil (31)	52 / 46 (88,5) 0,185	81 / 39 (48,1) 0,307	11 / 8 (72,7) 1,000	144 / 93 (64,6) 0,901

## 5. RASPRAVA

Otkriće JAK2 V617F mutacije 2005. godine (12) pomoglo je u razumijevanju bioloških i kliničkih svojstava MPN. Nedugo nakon toga određivanje prisutnosti V617F mutacije postaje jedan od kriterija za dijagnozu bolesti i procjenu odgovora na terapiju (15).

U ovom istraživanju analizirani su rezultati detekcije mutacije V617F gena *JAK2* u 59 ispitanika s područja istočne Hrvatske (Tablica 2.) kojima je potvrđena dijagnoza *BCR/ABL1* negativnih mijeloproliferativnih neoplazmi PV (Tablica 3.), ET (Tablica 4.) i PMF (Tablica 5.). Dobiveni rezultati učestalosti mutacije V617F gena *JAK2* uspoređeni su s literaturnim podacima za druge populacije (Tablica 6.).

Prosječna dob naših bolesnika s MPN u vrijeme testiranja na prisutnost JAK2 V617F je  $64,5 \pm 12,3$  godine. S obzirom na podtipove MPN najstariji ispitanici bili su iz skupine PMF ( $70,0 \pm 7,1$ ). Općenito su stariji bili bolesnici s MPN pozitivni za JAK2 V617F mutaciju ( $67,9 \pm 10,4$ ) u odnosu na bolesnike bez mutacije ( $53,9 \pm 15,5$ ). Rezultate analize naše skupine ispitanika možemo usporediti s epidemiološkim podacima za MPN koji govore u prilog tome da su MPN prvenstveno bolesti odrasle dobi (10).

Statistički značajnu razliku nalazimo u prosječnoj životnoj dobi V617F pozitivnih i negativnih pacijentica s ET. Značajno su starije ispitanice s ET pozitivne za mutaciju, a sličan odnos životne dobi JAK2 V617F pozitivnih i negativnih bolesnika nalazimo kod muškaraca s ET te kod PV za oba spola. Općenito je postotak mutiranih slučajeva veći u bolesnika s MPN starije životne dobi (22).

U skupini ispitanika s MPN 61,0 % je pozitivnih na mutaciju JAK2 V617F. U usporedbi s drugim istraživanjima postoje odstupanja (Tablica 6.), ali nisu statistički značajna. Ukupno u skupini MPN najviše bolesnika s mutacijom ima u istraživanju Kušec i sur. (81,1 %) (23).

Kod naših bolesnika mutacija je nađena u 55,3 % oboljelih od PV. U istraživanjima koja su provedena u Hrvatskoj za PV rezultati se razlikuju. Sličan rezultat našem nalazimo kod autora Radić Antolić i sur. (24) (58,8 %), dok je u studijama Načinović Duletić i sur. (25) (88,6 %) i Kušec i sur. (23) (93,0 %) učestalost mutacije u oboljelih od PV znatno veći, iako ne i statistički značajno. U drugim je populacijama Europe, Afrike, Azije i Južne Amerike

učestalost JAK2 V617F mutacije kod PV viša u odnosu na naše istraživanje, no razlika nije statistički značajna (10, 12, 26-31).

U oboljelih od ET u našem je istraživanju mutacija JAK2 V617F nađena kod 73,7 % oboljelih. Sličan rezultat našem ponovo nalazimo kod autora Radić Antolić i sur. (24) (70,0 %), te kod Portugalaca (26) i Indijaca (29). U ostalim je hrvatskim istraživanjima učestalost mutacije u ET niži (55,0 % i 60,0 %) (23, 25), slična učestalost je i u populacijama Velike Britanije (12) i Alžira (10), dok najmanje JAK2 V617F mutiranih u ET nalazimo u Egiptu (27) i Jordanu (28).

Mutacija JAK V617F je kod oboljelih od PMF u našem istraživanju zastupljena u 50,0 % ispitanika, jednako kao kod Portugalaca (26), Britanaca (12) i Alžiraca (10). Ostali hrvatski autori navode učestalost mutiranih u PMF od 54,0 % (23), 30,0 % (24) i 66,7 % (25). Znatnije niža učestalost mutacije kod PMF navodi se za Egipat (12,5 %) (27) i Jordan (14,3 %) (28), a nešto viša u odnosu na naše istraživanje za Brazil (72,7 %) (31).

## 6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja detekcije mutacije V617F gena *JAK2* u oboljelih od mijeloproliferativnih neoplazija u populaciji istočne Hrvatske može se zaključiti:

1. U skupini ispitanika PV je učestaliji podtip MPN u odnosu na ET i PMF.
2. Učestalost mutacije *JAK2* V617F viša je u oboljelih od ET u odnosu na PV i PMF.
3. U ispitivanoj skupini MPN najstariji su bili pacijenti iz skupine PMF.
4. Mutacija V617F gena *JAK2* prisutna je u bolesnika starije životne dobi.
5. *JAK2* V617F pozitivni muški oboljeli od PV su u odnosu na negativne statistički značajno stariji.
6. *JAK2* V617F pozitivne žene oboljele od ET su u odnosu na negativne statistički značajno starije.
7. U objavljenim studijama provedenim u Hrvatskoj i u drugim populacijama podaci za učestalost mutacije *JAK2* V617F kod oboljelih od PV, ET i PMF variraju. Naši se rezultati za sva tri podtipa MPN nalaze u okviru raspona učestalosti mutacije prisutnog u publiciranim studijama.

## 7. SAŽETAK

**Uvod:** Janus kinaze su citoplazmatske tirozin kinaze koje sudjeluju u prijenosu signala od citokinskih receptora do transkripcijskih čimbenika porodice STAT. Zbog mutacije V617F u genu *JAK2* dolazi do njegove stalne aktivacije. Mutacija V617F *JAK2* pokazuje povećanu pojavnost u mijeloproliferativnim neoplazmama: policitemiji vera (PV), esencijalnoj trombocitemiji (ET) i primarnoj mijelofibrozi (PMF).

**Ciljevi istraživanja:** Odrediti učestalost somatske stečene mutacije V617F gena *JAK2* u skupinama oboljelih od PV, ET i PMF u populaciji istočne Hrvatske. Usporediti dobivene rezultate s objavljenim literaturnim podacima.

**Ispitanici i metode:** Skupina ispitanika obuhvaća 59 bolesnika (26 M, 33 Ž) s dijagnozom mijeloproliferativnih neoplazmi (MPN): PV (38), ET (19) i PMF (2). DNK je izolirana iz uzoraka pune krvi. Detekcija *JAK2* V617F učinjena je metodom alel specifičnog PCR.

**Rezultati:** Učestalost mutacije *JAK2* V617F u skupini PV bila je 55,3 %, u ET 73,7 % i u PMF 50,0 %. Starije životne dobi su muški oboljeli od PV pozitivni na mutaciju u odnosu na negativne ( $P = 0,0025$ ), te žene oboljele od ET pozitivne na mutaciju u odnosu na negativne ( $P = 0,0455$ ).

**Zaključak:** Učestalost mutacije *JAK2* V627F viša je u oboljelih od ET u odnosu na PV i PMF. U skupinama PV i ET starije su životne dobi bolesnici s prisutnom mutacijom u odnosu na oboljele bez mutacije. Učestalosti mutacije *JAK2* V617F kod oboljelih od PV, ET i PMF variraju u različitim populacijama. Naši su rezultati u skladu s publiciranim studijama.

**Ključne riječi:** esencijalna trombocitemija, mutacija *JAK2* V617F, policitemija vera, primarna mijelofibroza

## 8. SUMMARY

### **Frequency of JAK2 V617F mutation in myeloproliferative neoplasms patients from Eastern Croatia**

**Introduction:** Janus kinases are cytoplasmic tyrosine kinases involved in signal transduction from cytokine receptors to STAT transcription factors. The JAK2 V617F mutation leads to permanent activation of the *JAK2*. Mutation V617F JAK2 shows increased incidence in myeloproliferative neoplasms (MPN): polycythemia vera (PV), essential thrombocytopenia (ET) and primary myelofibrosis (PMF).

**Objectives:** The aim of this research is to determine the incidence of V617F mutation in the *JAK2* gene in patients with PV, ET, and PMF in the population of eastern Croatia. Furthermore, the aim is to compare the results obtained with the data found in published literature.

**Participants and Methods:** The group of participants includes 59 patients (26 M, 33 F) with MPN diagnoses: PV (38), ET (19) and PMF (2). The DNA was isolated from a 5 mL full blood samples. Detection of JAK2 V617F was performed by allele specific real-time PCR technique.

**Results:** The JAK2 V617F mutation was found in 55,3 % of PV, 73,7 % of ET and 50,0 % of PMF cases. The presence of mutation was associated with older age in male participants with PV ( $P = 0,0025$ ), also with older age in female participants with ET ( $P = 0,0455$ ).

**Conclusion:** The frequency of JAK2 V617F mutation was highest in patients with ET, followed by PV and PMF. Different international publications reported a variable frequency of JAK2 V617F mutation for PV, ET and PMF. In general, our results are concordant to other published studies.

**Keywords:** essential thrombocythemia, JAK2 V617F mutation, polycythemia vera, primary myelofibrosis



## 9. LITERATURA

1. Mujagić Z, Mujagić H. Biohemizmi stanične transdukcije signala. Tuzla 2012;2-17.
2. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Stanična i molekularna imunologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2018.
3. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinović Škudar V, Marušić M, i sur. Imunologija. 7. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.
4. O'Shea JJ, Schwartz DM, Villarino AV, Gadina M, McInnes IB, Laurence A. The JAK STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. *Annu Rev Med.* 2015;66:311-28.
5. Yamaoka K, Saharinen P, Pesu M, Holt III ET, Silvennoinen O, O'Shea JJ. The Janus kinases (Jaks), *Genome Biol.* 2004;5:253.
6. Ungureanu D, Wu J, Pekkala T, Niranjana Y, Young C, Jensen ON, i sur. The pseudokinase domain of JAK2 is a dual-specificity protein kinase that negatively regulates cytokine signaling. *Nat Struct Mol Biol.* 2015;18(9): 971–6.
7. Min X, Ungureanu D, Maxwell S, Hammarén H, Thibault s, Hillert EK, i sur. Structural and Functional Characterization of the JH2 Pseudokinase Domain of JAK Family Tyrosine Kinase 2 (TYK2) *J Biol Chem.* 2015;290(45):27261–70.
8. My Cancer Genome org. JAK2 c.1849G>T (V617F) Mutation in Myeloproliferative Neoplasms. 2018.
9. Bench AJ, White HE, Foroni L, Godfrey AL, Gerrard G, Akiki S, i sur. Molecular diagnosis of the myeloproliferative neoplasms: UK guidelines for the detection of JAK2 V617F and other relevant mutations. *Br J Haematol.* 2013;160:25–34.
10. Benguella Benmansour M, Boucherit K, Benchikh N, Mesli N, Chabni N, Messaoudi A, i sur. Prevalence of JAK2 V617F Mutation in West Algerian Population with Chronic Myeloproliferative Neoplasms: A Multicenter Study, *J. Afr. Cancer.* 2014; 1–7.
11. Labar B. Hematologija, Zagreb, Školska knjiga; 2017; 223–35.

12. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, i sur. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders, *Lancet* 2005;365:1054–61.
13. Poopak B, Farsdousti Hagh M, Saki N, Elahi F, Rezvani H, Khosravipour G, i sur. JAK2 V617F mutation in Iranian patients with myeloproliferative neoplasms. Clinical and laboratory findings, *Turk J Med Sci.* 2013;43:347–3
14. Park SH, Chi HS, Cho YU, Jang S, Park CJ. The allele burden of JAK2 V617F can aid in differential diagnosis of Philadelphia Chromosome-Negative Myeloproliferative Neoplasm. *Blood res.* 2013;48:128–32.
15. Čaržavec D. ELN smjernice za Philadelphia negativne mijeloproliferativne neoplazme, *Krohem.* 2012;4(1):3-5.
16. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR i sur. JAK 2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med.* 2007;356:459-68.
17. Marušić M , Kušec R, JAK2 ekson 12 mutacije u policitemiji veri. *Krohem.* 2012;4(2):24.
18. Grand FH, Hidalgo Curtis CE, Ernst T, Zoi T, Zoi C, McGuire C, i sur. Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2009;113(24):6182-92.
19. Langabeer SE, Andrikovics H, Asp J, Bellosillo B, Carillo S, Haslam K, i sur. Molecular diagnostics of myeloproliferative neoplasms, *Eur J Haematol.* 2015;270–9.
20. Marušić M. Uvod u znanstveni rad u medicini. 4 izd. Zagreb. Medicinska naklada. 2008.
21. Roche Life Science. Dostupno na adresi: [https://lifescience.roche.com/global\\_en.html](https://lifescience.roche.com/global_en.html). Datum pristupa: 05.09.2018.
22. Randi ML, Ruzzon E, Tezza F, Scapin M, Duner E, Scandellari R, i sur. JAK2V617F mutation is common in old patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Aging Clin Exp Res.* 2009;23(1):17–21.

23. Kušec R, Marušić Vrsalović M, Ajduković R, Hariš V, Jakšić O, Romić Ž, i sur. Mutacija gena JAK2 u kroničnim mijeloproliferativnim bolestima. *Biochemia Medica* 2006;16(1):180.
24. Radić Antolic M, Zadro R, Juričević M, Bašić-Kinda S, Labar B. Učestalost mutacije V617F u genu za JAK2 u mijeloproliferativnim bolestima. *Biochemia Medica* 2006;16(1):182.
25. Načinović Duletić A, Grohovac D, Hadžisejdić I, Dekanić A, Roganović J, Grahovac B, i sur. Prevalence of the JAK2-V617F mutation in patients with chronic myeloproliferative disorders. *Clin Chem Lab Med*. 2010;48(5):28.
26. Azevedo AP, Silva SN, Reichert A, Lima F, Júnior E, Rueff J. Prevalence of the Janus kinase 2 V617F mutation in Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms in a Portuguese population. *Biomed Rep*. 2017;7(4):370–6.
27. Ebid GT, Ghareeb M, Salaheldin O, Kamel MM. Prevalence of the frequency of JAK2 (V617F) mutation in different myeloproliferative disorders in Egyptian patients, *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(9):11555–9.
28. Jaradat SA, Khasawneh R, Kamal N, Matalka I, Al-Bishtawi M, Al-Sweedan S, i sur. Analysis of JAK2V617F mutation in Jordanian patients with myeloproliferative neoplasms. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2015;8(4):160–6.
29. Sazawal S, Bajaj J, Chikkara S, Jain S, Bhargava R, Mahapatra M, i sur. Prevalence of JAK2 V617F mutation in Indian patients with chronic myeloproliferative disorders. *Indian J Med Res*. 2010;132:423-7.
30. Zhang SH, Li H, Lai RS. Detection of JAK2 V617F mutation increases the diagnosis of myeloproliferative neoplasms. *Oncol Lett*. 2015;9(2):735-8.
31. da Silva RR, Hatzlhofer BLD, Machado CGF, Lima ASM, de Albuquerque DM, dos Santos MNN, i sur. JAK2 V617F mutation prevalence in myeloproliferative neoplasms in Pernambuco, Brazil. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2012;16(7):802-5.

## 10. ŽIVOTOPIS

IME I PREZIME: Monika Petrović

ADRESA: Ivana Gundulića 21, 31431 Čepin

MOBITEL: +385 996760622

E-POŠTA: petrovimonika@gmail.com

DATUM RODENJA: 5. veljače 1980.

OBRAZOVANJE: 2010. – 2013.  
 Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku  
 Sveučilišni preddiplomski studij medicinsko laboratorijske  
 dijagnostike  
 1994. – 1998.  
 Medicinska škola Osijek  
 1986. – 1994.  
 Osnovna škola Miroslav Krleža Čepin

RADNO ISKUSTVO: 2001. – 2018.

POSLODAVAC: Klinički bolnički centar Osijek  
 Klinički zavod za transfuzijsku medicinu

RADNO MJESTO: Prvostupnica Medicinsko laboratorijske dijagnostike